

PCT/JP03/14389

12.11.03

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

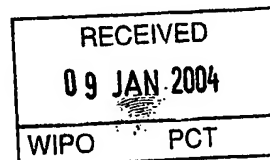
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年11月12日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-328866  
[ST. 10/C]: [JP2002-328866]

出 願 人  
Applicant(s): 持田製薬株式会社

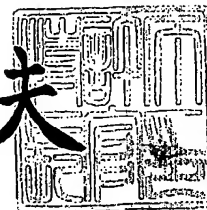


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年12月18日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3104900

【書類名】 特許願

【整理番号】 MD0646

【提出日】 平成14年11月12日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 39/00  
G01N 33/53

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区四谷一丁目 7 番地 持田製薬株式会社内

【氏名】 古迫 正司

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区四谷一丁目 7 番地 持田製薬株式会社内

【氏名】 白川 嘉門

【特許出願人】

【識別番号】 000181147

【氏名又は名称】 持田製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100080159

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡辺 望稔

【電話番号】 3864-4498

【選任した代理人】

【識別番号】 100090217

【弁理士】

【氏名又は名称】 三和 晴子

【電話番号】 3864-4498

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006910

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9715033

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒト低分子量CD14と結合する抗体

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドとは結合し、ヒト高分子量CD14とは結合しない抗体。

【請求項2】

ヒト低分子量CD14とは結合し、ヒト高分子量CD14とは結合しない抗体。  
。

【請求項3】

請求項1または請求項2の抗体を含むことを特徴とするヒト低分子量CD14の測定キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は配列番号1の16アミノ酸残基からなるペプチドとは結合し、ヒト高分子量CD14とは結合しない抗体、またはヒト低分子量CD14とは結合し、ヒト高分子量CD14とは結合しない抗体に関する。また、該抗体を含むヒト低分子量CD14の測定キットに関する。さらに該抗体の作成に有用なペプチド、該抗体の作成方法、及び敗血症の新規な診断方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

CD14分子は単核球細胞の膜表面上に発現している糖蛋白質を認識する一群の抗体により同定される蛋白質として1986年に第3回Leukocyte Typing Conferenceにて、命名された。1990年、WrightらはこのCD14分子が、エンドトキシンであるLPSのレセプターであることを明らかにした（非特許文献1参照）。このCD14分子は分子量53～55kDaの糖蛋白質で、mRNAは約1.4kbのサイズで356個のアミノ酸からなることがcDNAの解析から明らかにされた（非特許文献2参照）。

## 【0003】

ヒトCD14分子には、膜結合型CD14のほかにも可溶型CD14があり、血中には分子量の異なる複数の可溶型CD14が存在することが報告された（非特許文献3参照）。また、Landmannらは、敗血症患者血清の可溶型CD14のウエスタンブロット分析を行い、約55kDaの可溶型CD14が敗血症死亡例や発作性夜行性ヘモグロビン尿症（PNH）患者で高値であり、正常人血清中にはこの分子が認められず、正常人には分子量の少し小さい49kDaの可溶型CD14が検出されたことを報告した（非特許文献4参照）。この分子量の異なるサブタイプについては、糖鎖の違いが関与していること、またNおよびO結合型糖鎖を除去してもなお2種の異なる分子量の可溶型CD14が血中に存在することをStelzerらが報告している（非特許文献5参照）。また、Bullerらは可溶型CD14のC末端分析を行い可溶型CD14の327番のセリン残基にGPI基が結合すること、約56kDaの分子量を持つ可溶型CD14はGPIアンカリングされない分子種であることを報告した（非特許文献6参照）。

## 【0004】

CD14分子に対する抗体はBazilらの作製したMEM-18（非特許文献7参照）、Shuttらの作製したRoMo-1（非特許文献8参照）、Steinmanらの作製した3C10（非特許文献9参照）をはじめ、多くの抗CD14抗体が作製され、CD14蛋白質の同定に使用されている。また、これら抗体を用いた可溶型CD14の測定系がBazilら（非特許文献10参照）、Grunwaldら（非特許文献11参照）により報告され、ヒト体液中の可溶型CD14が測定されるようになった。さらに、可溶型CD14-ELISAキットがIBL-Hamburg、Medgenix、R&D Systemsより発売され、敗血症をはじめとして多くの疾患で可溶型CD14の測定が行われている（非特許文献12、13参照）。しかし敗血症以外の疾患でも疾患の進行度に伴って前述の約55kDa、49kDaを含む可溶型CD14（報告により、その分子量は異なるため、約55kDa、49kDaに限定されるわけではない、以下同）濃度が上昇し、可溶型CD14は敗血症特異的なマーカーではないこ

とが明らかになった（非特許文献14～16参照）。また、可溶性CD14は敗血症の重症化のマーカーとして期待されていたが、敗血症性ショックとの相関が見られないこと（非特許文献17参照）、全身性炎症反応症候群（SIRS）との相関が認められないことから（非特許文献18参照）、敗血症の診断薬としての意義は確立していない。

#### 【0005】

したがって、敗血症の診断は未だに確立された血清診断方法はなく、患者の症状所見に基づくSIRS判定、各種組織の重症度を指標とするSOFAスコア等により総合的に判断されている。診断方法としては、血中のエンドトキシンを指標とする方法が検討されているが、感度不足のため有効な手段とはなっていない。また、細菌性敗血症のマーカーとして開発されているプロカルシトニン（CRPやIL-6よりも敗血症患者の進行度と関連するとの報告がある（非特許文献19参照）。しかしながら、敗血症におけるプロカルシトニンの役割は確定していない。

#### 【0006】

発明者らはLandmannらが報告した上記約55kDaと49kDaの2種等の可溶性CD14（高分子量CD14（報告により、その分子量は異なるため、約55kDa、49kDaに限定されるわけではない、以下同））とは別に、約36kDaの可溶性低分子量CD14が血中に存在すること、また該可溶性低分子量CD14の測定が臨床上有用であること、その測定法として、血中可溶性CD14総量から、血中高分子量CD14量を差し引くことを提案している（特許文献1参照）。

#### 【0007】

##### 【特許文献1】

国際公開第WO01/22085号パンフレット

##### 【非特許文献1】

「サイエンス（Science）」、（米国）、1990年、第249巻、p. 1431-1433

##### 【非特許文献2】

「ヌクレイック アシッド リサーチ (Nucleic Acids Research)」、(英国)、1988年、16巻、p. 4173

【非特許文献3】

「ヨーロッパ ジャーナル オブ イムノロジー (European Journal of Immunology)」、(独国)、1993年、第23巻、p. 2144-2151

【非特許文献4】

「ザ ジャーナル オブ インフェクショウス ディゼーズ (The Journal of Infectious Disease)」、(米国)、1995年、第171巻、p. 639-644

【非特許文献5】

「ヨーロッパ ジャーナル オブ バイオケミストリー (European Journal of Biochemistry)」、(独国)、1996年、第236巻、p. 457-464

【0008】

【非特許文献6】

「ヨーロッパ ジャーナル オブ イムノロジー (European Journal of Immunology)」、(独国)、1995年、第25巻、p. 604-610

【非特許文献7】

「ヨーロッパ ジャーナル オブ イムノロジー (European Journal of Immunology)」、(独国)、1986年、第16巻、p. 1583-1589

【非特許文献8】

「アレルギー ウント イムノロジー (Allergie und Immunologie)」、(独国)、1988年、第34巻、p. 17-26

【非特許文献9】

「ジャーナル オブ イクスペリメンタル メディシン (Journal of Experimental Medicine)」、(米国)、1983年、

第158巻、p. 126-145

【非特許文献10】

「モレキュラー イムノロジー (Molecular Immunology)」、(英国)、1989年、第26巻、p. 657-662頁

【0009】

【非特許文献11】

「ジャーナル オブ イムノロジカル メソッズ (Journal of Immunological Methods)」、(蘭国)、1992年、第155巻、p. 225-232

【非特許文献12】

「クリニカル イムノロジー アンド イムノパソロジー (Clinical Immunology And Immunopathology)」、(米国)、1996年 第80巻、p. 307-310

【非特許文献13】

「臨床検査」、1994年、第38巻、p. 341-344

【非特許文献14】

「インフェクション アンド イムニティー (Infection and Immunity)」、(米国)、1999年、第67巻、p. 417-420頁

【非特許文献15】

「クリニカル アンド イクスペリメンタル イムノロジー (Clinical and Experimental Immunology)」、(英国)、2000年、第120巻、p. 483-487

【0010】

【非特許文献16】

「クリニカル アンド イクスペリメンタル イムノロジー (Clinical Experimental Immunology)」、(英国)、1994年、第96巻、p. 15-19

【非特許文献17】



「ペディアトリック アレルギー アンド イムノロジー (Pediatric allergy and immunology)」、(デンマーク)、1997年、第8巻、p. 194-199

【非特許文献18】

「ヨーロッパ ジャーナル オブ クリニカル インベスティゲーション (European Journal of Clinical Investigation)」、(英国)、1998年 第28巻、p. 672-678

【非特許文献19】

「クリニカル ケミストリー アンド ラボラトリー メディシン (Clinical chemistry and laboratory medicine)」、(独国)、2000年、第38巻、p. 41-46

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

かかる状況下において、敗血症患者の診断に有用である、ヒト低分子量CD14を高感度、簡便かつ特異的に定性又は定量する測定方法及びその測定キットが望まれている。さらには、その測定方法に有用な該ヒト低分子量CD14に対する特異的な抗体が望まれている。

【0012】

【課題を解決するための手段】

発明者等は鋭意研究の結果、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドとは結合し、ヒト高分子量CD14とは結合しない抗体を発明した。また、ヒト低分子量CD14とは結合し、ヒト高分子量CD14とは結合しない抗体を発明した。さらに該抗体を用いて、ヒト低分子量CD14の測定方法及びその測定キットを発明した。該測定方法は、敗血症の診断の指標として有用であることを明らかにした。さらに、該抗体の作成に有用なペプチド、該抗体の作成方法及び敗血症の新規な診断方法を発明した。

【0013】

すなわち、本発明は、以下の新規な抗体、及びヒト低分子量CD14の測定キットを提供する。以下、本発明の具体例を挙げる。

(1) 配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドとは結合し、ヒト高分子量CD14とは結合しない抗体。

(2) ヒト低分子量CD14とは結合し、ヒト高分子量CD14とは結合しない抗体。

(3) 上記(1)または(2)の抗体を含むことを特徴とするヒト低分子量CD14の測定キット。

(4) 上記(1)または(2)の抗体を使用することを特徴とするヒト低分子量CD14の測定方法。

さらに、以下のペプチド、抗体の作成方法及び敗血症の新規な診断方法を提供する。

(5) 配列番号1に記載の、アミノ酸残基の連続した8個以上のアミノ酸を含む各ペプチド。

(6) 上記(5)のペプチドを抗原とする抗体の作成方法。

(7) 低分子量CD14を抗原として抗体を作成し、高分子量CD14とは結合しない抗体を選択することを特徴とする、上記(1)または(2)の抗体の作成方法。

(8) 低分子量CD14を直接測定することを特徴とする敗血症の診断方法。

#### 【0014】

##### 【発明の実施の形態】

以下に、より詳細に本発明を説明する。

本発明で記載する「ヒト低分子量CD14」とは、ヒト血中に存在する可溶性蛋白質であり、ゲル濾過では分子量35-45kDaである。また、配列番号1のアミノ酸残基中の連続した8以上のアミノ酸配列と結合する抗体と結合し、さらに、ヒト高分子量CD14と結合する抗CD14抗体の一部と結合する蛋白質である。抗CD14抗体の一部とは、例えば配列番号2に記載のヒトCD14の17番から26番の領域を認識する抗体である。また、上記2種の抗体と同時に結合することができる蛋白質である。具体的な一例としては、WO01/22085号公報に記載の分子量約36kDaのヒト血中蛋白質を例示することができる。(以降、「ヒト」を省略し、低分子量CD14と記載することがある)

## 【0015】

本発明で記載する「ヒト高分子量CD14」とは、ヒト血中に存在する可溶型CD14蛋白質であり、配列番号2に記載のヒトCD14全長、若しくはその全長から41アミノ酸以下のC末端がプロセシングされたヒトCD14である。これらは先行技術の欄に記載したLandmannらの報告に記載される約55kDa、及び約49kDaの可溶型CD14が含まれる。(以降、「ヒト」を省略し、高分子量CD14と記載することがあるが、報告により、その分子量は異なるため、約55kDa、49kDaに限定されるわけではない、以下同。)

## 【0016】

本発明の第一の態様は、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドとは結合し、ヒト高分子量CD14とは結合しない抗体である。

本発明の抗体は、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する。配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合すれば、そのアミノ酸残基中の領域はいずれでもよく、特に限定されない。

配列番号1に記載の16アミノ酸残基のアミノ酸配列は、配列番号2に記載のヒトCD14の53番から68番までの16アミノ酸残基に該当し、現在ヒト蛋白質においてヒトCD14以外に該配列を有する他の蛋白質は知られておらず、ヒトCD14に特異的に含まれる配列である。

また、本発明の抗体は、ヒト高分子量CD14とは結合しないことを特徴とする。

また、本発明の抗体の別の態様は、ヒト低分子量CD14とは結合し、ヒト高分子量CD14とは結合しない抗体である。すなわち、低分子量CD14と特異的に結合し、高分子量CD14とは結合しない抗体である。

## 【0017】

本明細書で記載する「結合する」とは、本発明の抗体が配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチド若しくは低分子量CD14に結合する、通常の抗原抗体反応を示すことをいう。抗原抗体反応を示すことは、凝集法、サンドイッチ法、固相直接法または固相結合法、競合法等で確認できる。

本発明の抗体は、該ペプチド若しくは低分子量CD14に対する親和性として

表した場合の解離乗数(KD)は、 $10^{-7}$ M未満が好ましい。より好ましくは、 $10^{-8}$ M以下、さらに好ましくは $10^{-9}$ M以下である抗体である。

#### 【0018】

また、本発明において、抗体が「結合する」該ペプチド若しくは低分子量CD14との交差反応性と比較して、高分子量CD14との交差反応性が、1%以下であるとき、「高分子量CD14とは結合しない」という。

交差反応性が1%以下であれば、血中蛋白質の特異的測定に影響をほとんど及ぼさない。好ましくは交差反応性が0.3%以下、より好ましくは0.1%以下、さらに好ましくは0.01%以下、特に好ましくは0.001%以下である。

#### 【0019】

本発明の抗体はポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよい。本発明の抗体が由来する動物種は特に限定されない。抗体作成の容易さの面では、ウサギ、ヤギ等が好ましい。また分子種は特に限定されない。いずれのクラス、サブクラス及びアイソタイプに分類される免疫グロブリンであってもよい。また配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドとは結合し、高分子量CD14とは結合しない限り、Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>等の抗体断片も本発明に含まれる。

#### 【0020】

本発明の抗体の作成において、ヒトCD14由来のペプチドが抗原として重要である。ヒトCD14由来のペプチドとは、配列番号1に記載のアミノ酸残基の連続した8個以上のアミノ酸を含むペプチドであり、好ましくは、連続した10個以上、より好ましくは連続した12個以上、特に好ましくは連続した16個のアミノ酸を含むペプチドである。また、ペプチドのアミノ酸残基の上限には特に限定はないが、作成された抗体の有する低分子量CD14に対する特異性を増すために上限は16個が好ましい。さらに、ペプチドは配列番号1に記載のアミノ酸残基の連続した8個以上のアミノ酸を含めば、その他のアミノ酸配列に限定はないが、好ましくはペプチドすべてのアミノ酸配列が配列番号1に記載のアミノ酸配列由来であることである。

#### 【0021】

上記ペプチドは分子量が小さいため、通常免疫原性を持たない。このためキャリアと結合させて若しくはMultiple Antigen Peptide (MAP) 法を用いてMAPペプチドを調製して、免疫原性を有する分子量を有させ、免疫原とすればよい。

上記ペプチドと結合させるキャリアは、キャリア蛋白、ポリマーが挙げられる。キャリア蛋白は牛血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、サイログロブリンまたはオボアルブミン等の異種蛋白を用いればよい。これらキャリア蛋白は、ペプチド若しくはキャリア蛋白のアミノ酸に含まれる側鎖の官能基利用して、またはマレイミド基、N-ヒドロキシスクシニミド (NHS) 基若しくはグルタルアルデヒド基を導入して、上記ペプチドと結合させればよい。ポリマーはマンナン若しくはキトサン等の糖類、ポリビニルピロリドン (PVA) が挙げられる。これらポリマーは上記ペプチドと、吸着若しくは上記のような化学結合により結合させればよい。

#### 【0022】

本発明の抗体は公知技術を用いることにより作製できる（例えば、免疫実験操作法、日本免疫学会編、日本免疫学会発行、参照）。例えばポリクローナル抗体は下記の方法で作製できる。

上記のとおり調製した免疫原20～1000  $\mu$ g をフロインド完全アジュバント、RIBIアジュバント、ALUM等のアジュバントと混合し、各種動物に免疫することができる。各種動物としては馬、羊、ヤギ、ブタ、ウサギ、ラット、マウス等が使用可能である。免疫方法としては筋肉内投与、皮内投与、皮下投与、腹腔内投与、リンパ節投与等の方法が使用可能であり、初回投与後1～4週間間隔でフロインド不完全アジュバント、RIBIアジュバント、ALUM等のアジュバントと混合した免疫原を同様に投与することにより、あるいは免疫原を直接静脈内に投与することにより追加免疫を行うことができる。抗血清は、免疫した動物から通常の採血方法、例えば頸動脈、耳静脈、心臓、足の静脈等より血液を採取し、遠心等により血清を分離することにより調製することができる。得られた抗血清は硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム等を添加する塩析法により $\gamma$ グロブリン分画を沈殿させ、適当な緩衝液に透析後、プロテインA、プロテインG等の $\gamma$ グロブリン

を特異的に精製することができるアフィニティマトリクスを用いて目的のペプチドに対する IgG 画分の精製ポリクローナル抗体を調製することができる。また、上記免疫源としたペプチドと結合する抗体を選択することにより、特異精製することができる。

#### 【0023】

また、モノクローナル抗体は下記の方法で作製できる。

配列番号 1 に示されるアミノ酸残基の連続した 8 個以上のアミノ酸からなるペプチドを免疫原として免疫した哺乳動物の免疫細胞をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを作製し、このハイブリドーマの中から、上記ペプチドと結合する抗体を産生するクローンを選択することにより、本発明の抗体を作製することができる。好ましくは、53 番から 68 番までのアミノ酸残基の連続した 10 個以上からなるペプチドを免疫原とすることである。より好ましくは連続した 12 個以上、特に好ましくは連続した 16 個のアミノ酸からなるペプチドを免疫原とすることである。

免疫する哺乳動物は、特に限定されないが、細胞融合に使用するミエローマ細胞との適合性を考慮して選択することが好ましく、マウス、ラットまたはハムスター等が好ましい。ミエローマ細胞は、公知の種々の細胞が使用可能である。これには P3、P3U1、SP2/O、NS-1、YB2/O 及び Y3-Ag1, 2, 3 等の骨髓種細胞が含まれる。

#### 【0024】

免疫は公知の方法により行うことができる。例えば、抗原を腹腔内、皮下、静脈内またはフットパッド内に投与して行う。この抗原の投与はアジュバントを併用してもよく、また複数回投与することが好ましい。免疫細胞は抗原の最終投与の数日後、例えば 3 日後に、摘出した脾細胞またはリンパ節由来の細胞が好ましい。免疫細胞とミエローマ細胞との融合は、Milstein 等の方法 (Methods in Enzymol., 73 巻 3 頁) 等の公知の方法を用いて行うことができる。例えば、融合剤としてポリエチレングリコール (PEG) を使用する方法または電気融合法等が挙げられる。免疫細胞とミエローマ細胞との混合比は、それらが融合できる比率であれば限定されないが、免疫細胞に対し、ミ

エローマ細胞を1/10量ないし等量を使用することが好ましい。細胞融合をPEG（平均分子量1,000～4,000）を使用して行う方法ではPEG濃度は特に限定されないが50%で行うことが好ましい。また、融合効率促進剤としてジメチルスルフォキシド（DMSO）等の補助剤を添加してもよい。融合は37℃に加温したPEG溶液を混合した細胞に添加することにより開始し、1～5分間反応後、培地を添加することにより終了する。この融合により形成されたハイブリドーマをヒポキサンチン、チミジン及びアミノプテリンを含む培地（HAT培地）等の選択培地で1日～7日間培養し、未融合細胞と分離する。

#### 【0025】

得られたハイブリドーマをその産生する抗体により更に選択する。選択したハイブリドーマを公知の限界希釈法に従って単クローン化し、単クローン性抗体産生ハイブリドーマとして樹立する。ハイブリドーマの産生する抗体の活性を検出する方法は公知の方法を使用することができる。例えばELISA法、凝集反応法、ラジオイムノアッセイ法が挙げられる。樹立したハイブリドーマを公知の方法で培養し、その培養上清よりモノクローナル抗体を得ることができる。また、ハイブリドーマをこれと適合性を有する哺乳動物に投与して増殖し、その腹水より得ることができる。抗体の精製は、塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマト法またはアフィニティークロマト法等の公知の精製手段を用いて行うことができる。

#### 【0026】

また、ヒト低分子量CD14とは結合し、ヒト高分子量CD14とは結合しない抗体は、低分子量CD14を免疫原として上記と同様にポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を作製し、高分子量CD14とは結合しない抗体を選択することにより得ることができる。

低分子量CD14の調製方法は、WO01/72993号公報の実施例16に記載されている。また、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドとは結合し、ヒト高分子量CD14とは結合しない抗体を用いて、ヒト血清、好ましくは敗血症患者血清より、特異精製することにより調製できる。

高分子量CD14と結合しない抗体を選択するためには、得られた抗体と高分

子量CD14の結合を凝集法、サンドイッチ法、固相直接法若しくは固相結合法、または競合法等により測定すればよい。凝集法、サンドイッチ法、固相直接法若しくは固相結合法、または競合法についての記載は、後述する。

高分子量CD14の調製は、WO01/22085号公報の実施例5に記載の高分子量CD14に特異的な抗体を用いて行えばよい。

#### 【0027】

また、ヒトCD14のアミノ酸配列の一部からなるペプチドを免疫原として上記と同様に作製し、高分子量CD14とは結合しない抗体を選択することにより得ることができる。ヒトCD14のアミノ酸配列の一部からなるペプチドとは、高分子量CD14では蛋白の表面に露出されていない領域であり、低分子量CD14では3次元構造が異なるため蛋白表面上に露出されている領域を含むペプチドである。上記領域は3次元構造が異なるためと考えられるため、上記領域の解析はChou-Fasman及びRobsonの2次構造予測プログラム等を用いて行えばよい。例えば、配列番号1に記載の16個のアミノ酸配列中の連続した8個以上のアミノ酸を含む各ペプチド、または配列番号3に記載のアミノ酸残基を含むペプチドが挙げられる。

#### 【0028】

本発明に含まれる抗体の断片であるFab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>等も公知の方法（石川栄治、超高感度酵素免疫測定法、学会出版センター）で作製できる。

抗体を産生させる方法として、植物で産生する方法（Nature 342: 76、1989）、CHO細胞、マウスミエローマ細胞（S0）等の哺乳細胞で産生する方法（Biotechnology 36:35、1994）、ミルク中への産生させる方法（Nat. Biotechnol 17:456、1999）及び大腸菌で産生させる方法（Science 240:1038、1988）等が挙げられる。

#### 【0029】

免疫原とするペプチドの作成方法は、一般的に使用されるペプチド合成機（ペプチドシンセサイザー433A型、パーキン-エルマージャパン）等を用いた方



法、遺伝子組換え法（東京大学医科学研究所 制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコール、秀潤社）等が挙げられる。

例えば、配列番号 1 に記載のアミノ酸残基の連続した 8 個以上のアミノ酸からなるペプチドは 433A 型ペプチド合成機を用いて Fmoc 法により合成でき、TFA による脱保護、樹脂からの切断の後、C18 HPLC カラム（Capcell-pak、資生堂）を用いて精製し、目的のペプチドを調製することができる。

#### 【0030】

本発明の第二の態様は、本発明の抗体を使用することを特徴とするヒト低分子量 CD14 の測定方法である。

本発明の抗体は、ヒト高分子量 CD14 には結合しないため、ヒト低分子量 CD14 を高感度、簡便かつ特異的に定性又は定量する測定に使用することができる。本発明のヒト低分子量 CD14 の測定方法は本発明の抗体を使用することを特徴とし、免疫学的測定方法であれば特に限定されない。凝集法、サンドイッチ法、固相直接法または固相結合法、競合法等が例示される。この中でも、サンドイッチ法及び競合法が好ましく、特にサンドイッチ法が好ましい。

#### 【0031】

凝集法では、抗体を粒子、例えばラテックス粒子や赤血球（例えば羊赤血球）の表面に結合させて、被検物質が存在すると粒子の凝集が生じるようにし、この粒子の凝集の程度を指標として低分子量 CD14 を特異的に定性または定量する。

なお、この凝集法では、ラテックスや赤血球以外にも、ゼラチンやマイクロビーズ、カーボン粒子等、一般に用いられている粒子を使用することができる。

また、サンドイッチ法、固相直接法または固相結合法、競合法では、標識された抗体や抗原を使用し、エンザイムイムノアッセイ（EIA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、ケミルミネッセンスイムノアッセイ（化学発光免疫測定法）、フルオロイムノアッセイ（蛍光免疫測定法）、時間分解蛍光免疫測定法（TR-FIA）、イムノクロマトグラフィーアッセイ（ICA）等の原理で測定を行うことができる。

## 【0032】

サンドイッチ法は、測定する蛋白質を認識する部位の異なる2種類以上の抗体を用いて抗体-抗原-抗体複合体を形成させることにより測定する方法である。まず、ビーズ、ラテックス粒子、磁性粒子、プレート、チューブ等に第一の抗体を熱吸着法、化学結合法等により担体に結合させ、固相の抗体の非吸着面をその測定系には影響しないタンパク質、例えばBSA（ウシ血清アルブミン）などでブロッキング処理することにより、抗体結合担体を調製することができる。次いで測定に影響しない蛋白質、例えばBSA等を含む緩衝液で希釈した低分子量CD14または測定する検体を抗体固相担体に添加し、反応させる。一定時間反応させた後、洗浄して固相に結合しなかった物質を除去し、続けてペルオキシダーゼ、アルカリファオスファターゼ等の酵素、アクリジニウム、エクロリン等の化学発光物質、色素、ラテックス粒子等の物質により標識した第二の抗体を添加する。一定時間反応させた後、洗浄して複合体を形成しなかった標識抗体を除去し、標識物に基づく反応を行い、例えばペルオキシダーゼに対してはテトラメチルベンジジン-過酸化水素溶液等を用いて固相に結合した複合体の量を特異的に定性または定量する。サンドイッチ法は上記のように2段階で行う方法（2ステップ法）と抗原及び標識抗体を同時に加える1段階法（1ステップ法）のどちらを使用することもできる。

## 【0033】

本発明の抗体は、第一の抗体（固相化抗体）に使用しても、第二の抗体（標識抗体）に使用してもよい。サンプル中には低分子量CD14よりも高分子量CD14が多く含まれるため、低分子量CD14蛋白質を特異的に認識する抗体を固相側に使用することがより好ましい。

例えば、本発明の抗体が第一の抗体として使用する場合は、第二の抗体はヒト低分子量CD14に結合する抗体であれば特に限定されず、IgG、Fab、Fab<sub>2</sub>であっても構わない。上記の作成方法により作成すればよい。ただし、本発明の抗体がモノクローナル抗体である場合は、同一のモノクローナル抗体を第二の抗体とすることは避けた方がよい。感度の面から、固相化した抗体以外の領域を認識する抗体が好ましい。また、実際の測定をする前に予備的に、後

述する実施例 6 及び 9 と同様に、本発明の抗体と第二の抗体の候補の抗体とサンドイッチ法の系を構成し、測定感度を確認して、第二の抗体を選択することが好ましい。

#### 【0034】

固相直接法では、検体（試料）を直接固相に吸着させ、固相の低分子量の CD 14 蛋白質非吸着面を、その測定系には影響しないタンパク質、例えば BSA（ウシ血清アルブミン）などでブロッキング処理し、次いで低分子量 CD 14 を認識する酵素標識抗体を添加し、反応させる。以降は、サンドイッチ法と同様の操作を行い、検体中の低分子量 CD 14 を特異的に定性または定量する。

競合法では、使用する抗体が認識する一定量の低分子量 CD 14 を直接固相に吸着させ、次いでブロッキング処理した後、ここに、低分子量 CD 14 を認識する酵素標識抗体と検体（試料）とを添加する。一定時間反応させた後、洗浄して固相に非結合の物質を除去し、発色基質を加えて酵素と反応させる。検体添加による、酵素標識抗体の固相の低分子量 CD 14 への結合阻害度を測定することにより、検体中の低分子量 CD 14 を特異的に定性または定量する。

#### 【0035】

なお、はじめに抗体を固相に吸着させ、酵素標識した低分子量 CD 14 を検体と同時に添加し、検体添加による標識物の固相化抗体への結合阻害度を測定することにより、検体中の低分子量 CD 14 を特異的に定性または定量してもよい。

上記以外の方法として、抗原抗体反応を液相中で行い、後に、抗体を用いた凝集沈降法もしくは物理化学的な手法によって、標識抗体と結合した低分子量 CD 14 を分離し、低分子量 CD 14 を特異的に定性または定量する方法もある。また、低分子量 CD 14 を認識する抗体を標識するのではなく、その抗体を認識する二次抗体を得、それを標識し、抗原抗体反応を行わせて、低分子量 CD 14 を特異的に定性または定量することも可能である。

#### 【0036】

後述する実施例 6、11 及び 12 に記載の通り、本発明の抗体を用いて正常人及び各種患者の血中の低分子量 CD 14 を測定したところ、敗血症患者の血中で特異的に低分子量 CD 14 量が高いことが確認された。このことから、上記の低

分子量CD14の測定方法を用いて測定した結果を、敗血症の診断の指標とすることができる。例えば、患者の血中の低分子量CD14の量を求め、これを正常人の測定結果の平均値をとる等により標準化した正常人の値または正常人の値の範囲と比較することにより行う。例えば、正常人の平均値+2SDまたは3SDをカットオフ値として、それよりも低分子量CD14値が高い場合は陽性の指標とする等である。また、予め正常人および敗血症患者の低分子量CD14濃度の値またはその範囲を標準化した値と、各個体の低分子量CD14の測定値とを比較することにより診断の指標とすることもできる。例えば、正常人の低分子量CD14値を0~0.1  $\mu\text{g/mL}$ とし、敗血症患者の値を0.2  $\mu\text{g/mL}$ 以上として測定値と比較し、陰性、擬陽性または陽性の指標とする等である。

#### 【0037】

本発明の第三の態様は、本発明の抗体を含むことを特徴とするヒト低分子量CD14の測定キットである。本発明のキットは、本発明の抗体を含むことを特徴とする。免疫学的測定法であれば、測定原理は、特に限定されない。また本発明の抗体が含まれていれば、その他は測定原理に必要な試薬が含まれていれば良く、測定原理に基づく測定結果を阻害しない限り、含まれるものは限定されない。測定原理の例示、及びその原理に応じた任意の構成要素については、本発明の第一の態様の説明で記載した通りである。

#### 【0038】

例えば、サンドイッチ法を原理とする本発明のキットの場合、任意の構成要素として、本発明の抗体を吸着または化学結合等により固定化させる固相、標識された第二の抗体（標識抗体）、検体若しくは標識抗体の緩衝液、標識抗体に酵素が使われる場合のその酵素に適した基質及び発色剤、ブロッキング剤、洗浄剤または停止剤等を含む診断試薬またはキットが例示される。「第二の抗体」とは、ヒト低分子量CD14に結合すれば、他の血中可溶性蛋白質、例えば高分子量CD14、に結合しても構わない。

#### 【0039】

固相としては、マイクロタイタープレート、プラスチックビーズ、磁性粒子またはメンブラン等が挙げられる。

標識抗体はペルオキシダーゼ、オキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ウロキナーゼ若しくは $\beta$ ガラクシダーゼ等による酵素標識、アクリジニウム若しくはエクオリン等による化学発光標識、またはFITC等による蛍光標識により標識された抗体が挙げられる。

酵素に対する基質（発色剤）は、ペルオキシダーゼにはテトラメチルベンジジン等、アルカリフォスファターゼにはp-ニトロフェニルフォスフェート等が挙げられる。

#### 【0040】

本発明のキットは、本発明の抗体を含むことを特徴としており、低分子量CD14を特異的に測定できる。本発明のキットに使用する検体は、水性の検体が好ましい。特に血液、血清若しくは血漿等の血液成分、尿、その他の体液、細胞培養上清、またはカラム溶出液等が好ましく、これらに含まれる低分子量CD14の測定に有用である。しかし、ヒトの血液成分以外からの検体、例えばヒト尿若しくはその他の体液、ヒト以外の種からの血液成分、尿若しくはその他の体液、細胞培養上清、またはカラム溶出液等の検体では、低分子量CD14だけではなく、低分子量CD14類似の蛋白質、ポリペプチド等も測定することが可能である。本発明の抗体を含む限り、上記の低分子量CD14類似の蛋白質、ポリペプチド等の測定キットも、本発明のキットに含まれる。

本発明のキットで特異的に測定できる低分子量CD14は、本発明の第一の態様の説明で記載した通り、敗血症の診断の指標となる。このため、本発明のキットは、敗血症の診断に有用である。

#### 【0041】

本発明の第四の態様は、配列番号1に記載のアミノ酸残基の連続した8個以上のアミノ酸を含むペプチドである。具体的には、下記1)～9)のアミノ酸配列を含む任意の配列を有するペプチドであり、好ましくは任意の配列は配列番号1中の下記配列に連続する上流側および・または下流側配列であり、合計10個以上、12個以上さらには16個以上であるのが好ましい。上限は16個が好ましい。

1) Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro

- 2) Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg
- 3) Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln
- 4) Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr
- 5) Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala
- 6) Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala Asp
- 7) Asp Pro Arg Gln Tyr Ala Asp Thr
- 8) Pro Arg Gln Tyr Ala Asp Thr Val
- 9) Arg Gln Tyr Ala Asp Thr Val Lys

本発明のペプチドを抗原として、本発明の抗体を作成することができる。

本発明のペプチドを抗原として作成された抗体は、低分子量CD14と結合し、高分子量CD14とは結合しない。このことから、ヒトCD14の53番から68番までの領域は低分子量CD14では、該領域が蛋白表面にあり本発明のペプチドと同様な立体構造を有しており、高分子量CD14では、本発明のペプチドとは異なる立体構造を有していることが類推される。

このため、ヒトCD14の53番から68番までのアミノ酸残基に該当する配列番号1に記載のアミノ酸残基を含むペプチドは本発明の抗体を作成する上で重要な抗原となる。

本発明のペプチドは本発明の第一の態様に記載した方法により作成することができる。

#### 【0042】

本発明の第五の態様は、本発明のペプチドを抗原とすることを特徴とする抗体の作成方法である。抗原として用いるペプチドの好ましい例は、本発明のペプチドの好ましいペプチドの例と同様である。

また、本発明の抗体の作成方法の別の態様は、低分子量CD14を抗原として抗体を作成し、高分子量CD14とは結合しない抗体を選択することを特徴とする、(1)若しくは(2)の抗体の作成方法である。本作成方法の特徴は、まず低分子量CD14を抗原として抗体を作成し、次に作成した抗体を低分子量CD14と結合し、高分子量CD14とは結合しない抗体を選択して、抗体を作成することである。

本発明の方法の詳細は本発明の抗体の態様に記載したとおりである。

#### 【0043】

本発明の第六の態様は、低分子量CD14を直接測定することを特徴とする敗血症の診断方法である。本発明の敗血症の診断方法は低分子量CD14を直接測定することを特徴とする。好ましくは本発明の抗体を用いて、直接測定し、敗血症を診断する方法である。より好ましくは本発明のキットを用いて直接測定し、敗血症を診断する方法である。

本発明の方法の詳細は本発明の測定方法の態様及びキットの態様に記載したとおりである。

#### 【0044】

##### 【実施例】

以下に、実施例をもって本発明を一層具体的に説明するが、これらは一例として示すものであり、本発明はこれらにより何等限定されるものではない。また、以下の記載において用いる略号は当該分野において慣例として用いられる略号に基づくものである。また、アミノ酸配列のアミノ酸の番号は配列表の配列番号1に記載の番号を記載した。

#### 【0045】

(実施例1) 免疫原とするペプチドの調製

##### 1-(1) ペプチドの配列の選択

WO01/22085号公報に、抗CD14抗体の一部には結合し、CD14のC末端側に結合する抗CD14抗体には結合しない分子量約36kDaのヒト血中蛋白質（低分子量CD14、低分子量の可溶型CD14蛋白質）が記載されている。該ヒト血中蛋白質に結合し、高分子量CD14（具体的には血中に存在する分子量49kDa、55kDa等のnative CD14、以下、native CD14と記載することがある）には結合しない本発明の抗体を作成するために、該抗体のエピトープとなりえる配列を検討した。

#### 【0046】

該ヒト血中蛋白質が上記の性質を有することから、該ヒト血中蛋白質は、native CD14のアミノ酸配列を少なくとも一部有すること、またはnat

ive CD14のアミノ酸配列が一部欠損した蛋白質であることがわかる。

さらに該ヒト血中蛋白質は、炎症性サイトカイン産生抑制活性を有している（WO01/72993号公報）。炎症性サイトカイン産生抑制活性がヒトCD14のN末端1～285番目のアミノ酸を有する可溶性ポリペプチド（以下、sCD14（1-285）と記載）及びヒトCD14のN末端1～307番目のアミノ酸を有しかつ286番目のセリンをシステインに置換した組換えポリペプチド（以下、sCD14（1-307）S286Cと記載）にも有すること（WO01/72993号公報）から、該ヒト血中蛋白質はヒトCD14のN末端から285アミノ酸程度の長さを有する蛋白質であることを仮定した。

#### 【0047】

次に、356アミノ酸を有するnative CD14では蛋白の表面に露出されていない領域、すなわちnative CD14に対する抗体が結合できない領域であり、低分子量CD14ではnative CD14とは3次元構造が異なるため蛋白表面上に露出されている可能性のある領域の解析を試みた。

配列番号1のnative CD14のアミノ酸配列をChou-Fasman及びRobsonの2次構造予測プログラムを用いて解析したところ、280番目から285番目の配列は $\beta$ シート構造を有していた。このことからnative CD14では表面に露出されていない領域であることがわかった。CD14（285）ではC末端に属するため、表面上に露出されている領域であると考えた。このため、280番目から285番目の配列付近を、本発明の抗体のエピトープとなりえる配列の候補とした。

#### 【0048】

また、61番目から68番目までが $\beta$ シート構造を有していた。さらに、57番目から64番目まではLPS結合領域であるとの報告（The Journal of Biochemical Chemistry、270、10、P5213-5218、1995）があることから、該領域は疎水性が高いと想定した。これらのことから、53番目から68番目の本発明の配列付近を本発明の抗体のエピトープとなりえる配列の候補とした。

上記2つの配列の候補は、NCBIのデータベースで検索（解析）したところ



、ヒトCD14の配列のみ存在する配列であることがわかった。

以上の解析に基づき、配列番号1に記載の配列（配列番号2に記載の53番目から68番目の配列に該当）及び配列番号3に記載の配列（配列番号2に記載の275番目から285番目の配列に該当）を有するペプチド（以下、それぞれS68ペプチド及びR285ペプチドと記載）を、免疫原として選択した。

#### 【0049】

##### 1-(2) ペプチドの調製

選択したS68ペプチド及びR285ペプチドは、N末端でSH基を介してキャリア蛋白質と結合させるため、N末端にシステインを挿入して合成した。すなわち、ペプチド合成機ABI433A（アプライド）を用いて、アミノ酸配列に従ってアミノ酸カラムを並べ、N末端にシステイン用のアミノ酸カラムを設置し自動合成を行った。合成したペプチドは定法により樹脂より切り出し、エーテルで沈殿させ回収後、再度蒸留水で溶解し凍結乾燥した。得られた粗精製ペプチドは溶解後、C18逆相HPLC（CAPCELL-PAK、資生堂）を用いて5～70%のアセトニトリル濃度の直線グラジエントで溶出し、目的のペプチドを含む分画を回収した。回収した分画は凍結乾燥し、それぞれ精製ペプチドとして2～3mgを得た。

#### 【0050】

##### （実施例2） 合成ペプチドを用いたペプチドキャリア抗原の調製

実施例1で調製した2種類のペプチドをそれぞれ蒸留水で10mg/mlに溶解し、10mg/mlのマレイミド化キーホールリンペットヘモシアニン（Imject Maleimid Activated keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) (PIERCE)）と等量混合した。室温で2時間反応後、生理食塩水で平衡化したNAP-10カラム（アマシャム バイオサイエンス）で脱塩し、R285ペプチドキャリア抗原及びS68ペプチドキャリア抗原（以下、R285ペプチド-KLH、S68ペプチド-KLHと記載）を1mg得た。以下の実施例に記載の蛋白質濃度は使用したKLH量を液量で割ったものを使用した。

#### 【0051】

## (実施例3) 合成ペプチドを免疫原としたポリクローナル抗体の作製

実施例2で調製したR285ペプチド-KLH及びS68ペプチド-KLHに対するポリクローナル抗体を作製するため、それぞれのペプチド-KLHを用いてウサギに免疫を行った。すなわち、それぞれのペプチド-KLH各100 $\mu$ gを500 $\mu$ lの生理食塩水に希釈し、500 $\mu$ lのフロインド完全アジュバント(DIFCO)と等量混合後、ニュージーランド白色ウサギ(北山ラベス)メス2.1-2.2kgの背部皮下に投与した。その2週間後、それぞれのペプチド-KLH各100 $\mu$ gを500 $\mu$ lの生理食塩水に希釈し、500 $\mu$ lのフロインド不完全アジュバント(DIFCO)と等量混合後、背部皮下に投与した。さらにその2週間後、それぞれのペプチド-KLH100 $\mu$ gを1mlの生理食塩水に希釈し耳静脈内に投与した。

## 【0052】

投与終了1週間後、耳静脈より採血し、定法にしたがい抗血清を分離し、抗体を精製した。まず抗血清に最終飽和濃度33%となるように硫酸アンモニウムを添加し、4℃で1時間攪拌後、析出した沈殿を遠心分離した。次に沈殿を76mMリン酸緩衝液(以下、PBS(pH6.4)と記載)で溶解し、一夜透析した。透析液を濾過後、プロテインAカラム(プロセップA、ミリポア)にアプライし、結合したIgG画分を0.1Mグリシン塩酸緩衝液(pH3.0)により溶出し、精製抗体を得た。PBS(pH6.4)で透析後、280nmの吸光度より蛋白濃度を算出した(吸光係数:0.533mg/mL)。以降、得られた抗体をそれぞれS68ペプチドポリクローナル抗体、R285ペプチドポリクローナル抗体と記載する。

## 【0053】

## (実施例4) 特異精製ポリクローナル抗体の調製

S68ペプチドポリクローナル抗体よりS68ペプチドに対する抗体のみを精製するため、以下の方法により特異精製を行った。まず、システインを挿入したS68ペプチド(以下、C-S68ペプチドと記載)をSH基を介して担体に結合させるため、マニュアルに従ってSulfoLink Coupling Gel(PIERCE)1mLあたりC-S68ペプチド200 $\mu$ gを混合し反応

した。反応終了後残った活性基をブロッキングし、S68ペプチド結合アフィニティーカラムを調製した。次に、実施例3に記載の精製IgG画分7.92mgをアプライし、リン酸緩衝液(pH7.4)(ダルベッコ、以下、D-PBS(pH7.4)と記載)でカラムを洗浄し、次に0.1Mグリシン塩酸緩衝液(pH3.0)で結合した抗S68ペプチド抗体を溶出した。溶出後pHを中性に戻しPBSで透析後、蛋白質濃度を280nmの吸光度より算出した(吸光係数: 0.533mg/mL)ところ、0.52mgの抗S68ペプチド抗体(以下、S68抗体と記載)が得られた。

#### 【0054】

(実施例5) 合成ペプチドを免疫原としたモノクローナル抗体の作製

実施例2で調製したS68ペプチド-KLH20μgを100μLの生食に溶解し、フロインド完全アジュバント(DIFCO)と等量混合し、Wistarラット8週齢メスの各後足フットパッドに100μLづつ投与した。2週間後、腸骨リンパ節を摘出し細胞融合を行った。細胞融合は安東民衛・千葉丈/著「単クローン抗体実験操作入門」83ページ、1991年(講談社)にしたがって行った。すなわち、リンパ節よりセルストレイナー(ファルコン)を用いてリンパ球を分離し、ミエローマ細胞(Sp2/O-Ag14)と5:1で混合し、ポリエチレングリコールを用いて細胞融合を行った。融合した細胞をHAT培地にケンダクし、ハイブリドーマを選別後、目的の抗体を産生しているハイブリドーマをスクリーニングした。

#### 【0055】

スクリーニングはsCD14(1-307)S286Cを直接プレートに固相化するELISA法を用いた。すなわち、イムノプレート(Maxisorb、NUNC)に0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)で1μg/mLに希釈したsCD14(1-307)S286Cを各ウエルに50μL添加し、37℃で1時間静置した。次にプレートをイオン交換水で5回洗浄後、0.1%BSAを含むPBS(pH6.4)を各ウエルに100μL添加し、室温で1時間静置してブロッキングを行った。得られたハイブリドーマからサンプリングした培養上清を各ウエルに添加し37℃で1時間反応させた後、0.05%Tween20を含

む生理食塩水で3回洗浄した。次にペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体 (DAKO) を10%ウサギ血清を含むPBSで1000倍に希釈した溶液を各ウェルに50  $\mu$ L添加した。37℃で1時間反応後、同様に5回洗浄しテトラメチルベンジジン溶液 (TMB、BioFix) を各ウェルに添加した。室温で10分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止した。450nmの吸光度をプレート分光光度計 (NJ-2100、日本インターメッド) で測定し、sCD14 (1-307) S286Cと結合する抗体を産生するハイブリドーマを含むウェルを選択した。

#### 【0056】

次に選択したウェルより安東民衛・千葉文／著「単クローン抗体実験操作入門」83ページ、1991年 (講談社) にしたがって限界希釈法によりクローニングを行った。10日後、同様にsCD14 (1-307) S286Cに対する反応性を指標としてスクリーニングを行い、6種類のハイブリドーマを選択した。選択したハイブリドーマを10%FCS/RPMI-1640培地 (Sigma) で培養後、Hybridoma-SFM培地 (Invitrogen) で培養し抗体を産生させ、プロテインGカラム (Prosep-G、ミリポア) を用いて抗体を精製した。精製したF1146-17-2抗体のサブタイプをラットタイプニングキット (ZYMED) を用いて決定したところサブタイプはラットIgG2b  $\cdot$   $\kappa$ であった。

なお、sCD14 (1-307) S286Cは、WO01/72993号公報の実施例9に記載の方法を用いて調製した。

#### 【0057】

(実施例6) ヒト低分子量CD14の測定系の検討

実施例4及び実施例5に記載の抗体を用いて、サンドイッチEIA法によるヒト低分子量CD14の測定系を検討した。

#### 【0058】

6-(1) 組換えヒトCD14の調製

まず、サンドイッチELISA法の第二の抗体とするsCD14 (1-285) に対するモノクローナル抗体を作製するため、その免疫原であるsCD14 (

1-285) を大腸菌で調製した。sCD14 (1-285) を大腸菌で発現させるために、以下の方法で発現プラスミド pTrp1659 を構築した。まず、オリゴマー 8, link S (5' -AGC TTA GGA ATT T-3' ) (配列番号 4) 及びオリゴマー 8, link A (5' -CTA GAA ATT CCT A-3' ) (配列番号 5) を合成した。これらのオリゴマーを等量混合し、99℃で1分間加温した後に、室温まで徐々に冷却してアニーリングを行った。さらに T4 Polynucleotide Kinase で 5 末端をリン酸化してリンカーを作製した。次にセンスプライマー (5' -ACA TCT AGA TGA CCA CGC CAG AAC CT-3' ) (配列番号 6) 及びアンチセンスプライマー (5' -TTT GGA TCC TTA CTA GAG ATC GAG CAC TCT-3' ) (配列番号 7) を合成し、WO01/72993 号公報の実施例 8 に記載のプラスミド pM1659 を鋳型に Pyrobest DNA polymerase を用いて PCR を行った。反応液を 90℃で2分間加温した後に、98℃ 10秒、55℃ 30秒、72℃ 1分のサイクルを 30 回繰り返して行った。

#### 【0059】

得られた約 900bp の増幅物を XbaI と BamHI で double digestion して、DNA 断片を回収した。特開平 06-025289 号公報の実施例 10 に記載のベクター pM710 を HindIII と BamHI で double digestion した後に、アガロースゲル電気泳動を行い、回収した。前述したリン酸化済みリンカー、PCR 増幅 DNA 断片 / XbaI + BamHI 消化断片、そしてベクター / HindIII + BamHI 断片の 3 種を ligation した後に (three-way ligation)、大腸菌コンピテントセル (JM109 (TOYOBO)) に transformation をを行い、目的のプラスミドを含むクローンを得た。プラスミド DNA は定法により調製した。

#### 【0060】

次に sCD14 (1-285) を生産するための JE7924 形質転換株をエレクトロポレーション法により調製した。まず、大腸菌 JE7924 (J. B

acteriol 173 4799頁 (1991)) をグリセロールストックより回復し、LB培地にて37℃ 一晚培養した。さらに50mlのLB培地に植菌し直し、600nmの吸光度が0.5~0.6になるまで培養を続けた後に、培養フラスコごと30分間氷冷した。次に大腸菌を集菌し、氷冷した滅菌蒸留水にて2回、氷冷した10%グリセロール溶液で1回洗浄した後に、氷冷した10%のグリセロール溶液100 $\mu$ lに懸濁した。50 $\mu$ lずつ2本のチューブに分注して、液体窒素で急速凍結し、コンピテントセル (JE7924) を調製し、使用時まで-80℃で保存した。

#### 【0061】

次に、JE7924コンピテントセル50 $\mu$ lにpTrp1659約30ngをエレクトロポレーション法で導入した。機器はBIO-RAD社のGene Pulserを使用した。また、その時の設定はVoltage 2.5kV、Resistor 200 $\Omega$ 、Capasitor 25 $\mu$ Fで行った。その後、50 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むLBアガープレートで一晚培養することで、pTrp1659が導入された形質転換株を得た。このクローンをLB培地にて37℃で一晚培養した後に、新しい培地に再度植菌し直し、さらに5時間培養した。600nmの吸光度が2~3であることを確認し、3 $\beta$ -INDOLE ACRYLIC ACID (Sigma社) を終濃度100 $\mu$ g/mlの濃度で添加し、37℃で4時間培養を行い、sCD14 (1-285) を誘導発現させた。次に、大腸菌を回収し、BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen社) を用いてInclusion bodyを調製した。その後、SDS-PAGE用バッファーにて溶解し、SDS-PAGEを行い、抗CD14抗体によるWestern blottingでsCD14 (1-285) の発現を確認した。

#### 【0062】

免疫原用sCD14 (1-285) は同様にJE7924形質転換株を1lのLB培地で培養し調製した。まず培養液を遠心分離し、大腸菌を集菌後、菌体をD-PBSで洗浄し、集めた菌体に50mlの Bug Buster Protein Extraction Reagent (Novagen、以下Bu

g Busterと記載)を加えて懸濁し、室温で30分間放置した。菌体溶解後、10分間ソニケーション(US-3、井内盛栄堂)処理し、 $10000\times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ にて20分間遠心分離し、上清を除去した。再度同様にソニケーション処理し、得られた沈殿を50mlのBug Busterに懸濁した。懸濁液に1mlの $10\text{mg/ml}$ のリゾチーム(生化学工業)を加えて緩やかに攪拌後、室温で10分間放置し、続けて200mlの10分の1量の高濃度Bug Busterを加えて攪拌後、同様に遠心分離し、上清を除去した。得られた沈殿に、200mlの1/10濃度のBug Busterを加えて懸濁し、同様に遠心分離し、この操作を数回繰り返した。最終的に得られた沈殿に100mlのD-PBSを加え、Inclusion Bodyを得た。

#### 【0063】

sCD14(1-285)の調製は、まずInclusion Bodyを1%のTritonX100を含むTE緩衝液(pH8.0、ニッポンジーン)に溶解し、凍結融解を3回行い、遠心し沈殿を回収した。再度1%のTritonX100を含むTE緩衝液(pH8.0、ニッポンジーン)に溶解し、氷冷後 $250\mu\text{A}$ で10秒間隔で12分間超音波処理を行い、遠心後沈殿を回収した。沈殿を1%のTritonX100、0.2M NaOHを含むTE緩衝液(pH8.0、ニッポンジーン)に溶解し、 $37^{\circ}\text{C}$ で10分間処理、遠心、再溶解を3回行った後、沈殿を回収した。得られた沈殿を6Mのグアニジン塩酸を含む水溶液に溶解し、精製sCD14(1-285)を調製した。濃度はBSAを標準品としてブラッドフォードのタンパクアッセイ法により算出した。

#### 【0064】

##### 6-(2) 抗CD14モノクローナル抗体の作製

##### [1] F1106-13-3抗体の作製

上記に記載の大腸菌由来sCD14(1-285)を投与抗原として、モノクローナル抗体を作製した。まず、ddyマウス6週齢メスの腹腔に精製sCD14(1-285) $20\mu\text{g}$ をフロインド完全アジュバント(DIFCO)と等量混合して $200\mu\text{L}$ 投与した。2週間後、精製sCD14(1-285) $20\mu\text{g}$ をフロインド不完全アジュバント(DIFCO)と等量混合し、腹腔内に20

0  $\mu$  l 投与した。細胞融合3日前にマウスの腹腔に抗原50  $\mu$  gを投与した。3日後、無菌的に脾臓を摘出し、脾臓よりリンパ球を分離し、安東民衛・千葉丈／著「単クローン抗体実験操作入門」83ページ、1991年（講談社）にしたがってミエローマ細胞（P3 $\times$ 63-Ag. 8. U. 1）と10:1で混合し、ポリエチレングリコールを用いて細胞融合を行った。HAT培地によりハイブリドーマを選別後、sCD14（1-285）と結合する抗体を産生しているハイブリドーマのスクリーニングをELISA法で行った。

#### 【0065】

まず、sCD14（1-285）をPBS（pH6.4）で0.4  $\mu$  g/mLに希釈し、イムノプレート（Maxisorb、NUNC）の各ウエルに50  $\mu$  L添加した。4℃で一晩反応後、イオン交換水で5回洗浄し、0.5%BSAを含むPBS（pH6.4）を各ウエルに100  $\mu$  L添加し、ブロッキングを行った。サンプリングした培養上清を各ウエルに添加し37℃で1時間反応させた後、0.05%Tween20を含む生理食塩水で3回洗浄した。次にペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体（DAKO）を10%ウサギ血清を含むPBSで1000倍に希釈した溶液を各ウエルに50  $\mu$  L添加した。37℃で1時間反応後、同様に5回洗浄しテトラメチルベンジジン溶液（TMB, BioF x）を各ウエルに添加した。室温で10分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止した。450nmの吸光度をプレート分光光度計（NJ-2100、日本インターメッド）で測定し、sCD14（1-285）と結合する抗体を産生するハイブリドーマを含むウエルを選択した。次に選択したウエルより安東民衛・千葉丈／著「単クローン抗体実験操作入門」83ページ、1991年（講談社）にしたがって限界希釈法によりクローニングした。10日後、同様にsCD14（1-285）に対する反応性を指標としてスクリーニングを行い、ハイブリドーマを選択したところ12種類の抗sCD14（1-285）モノクローナル抗体産生ハイブリドーマが得られた。

#### 【0066】

選択したハイブリドーマを10%FCS/RPMI-1640培地（Sigma）で培養後、Hybridoma-SFM培地（Invitrogen）で培



養し抗体を産生させ、プロテインA (Prosepe-A、ミリポア) を用いて抗体を精製した。特に反応性の高い抗体であるF1106-13-3抗体のサブタイプをIsoStrip Mouse Monoclonal antibody Isotyping Kit (Roche) を用いて決定したところサブタイプはIgG2b・ $\kappa$ であった。

次に樹立したF1106-13-3抗体の結合領域(エピトープ)を明らかにするため、CD14のアミノ酸配列をN末端側から10アミノ酸ずつ合成したペプチドライブラリーメンブレン (Custom SPOTs、Sigma Genosys) を用いて解析した。すなわち、メンブレンをマニュアルに従ってブロッキングした後、F1106-13-3抗体を反応させ、洗浄後、 $\beta$ ガラクトシダーゼ結合抗マウス抗体を反応させた。メンブレンを洗浄後、X-galを用いて抗体が結合するペプチド配列を検出した。なお、ペプチドライブラリーメンブレンのペプチドの配列は、1番目から154番目までのアミノ酸配列をC末端の2アミノ酸を重ねる形で10アミノ酸ずつ合成した19ペプチドを解析に使用した。ペプチドは実施例1-(2)と同様に調製した。

その結果、F1106-13-3抗体はCD14のN末端より17~26番のアミノ酸配列(CNFSEPPQPDW)と結合することが明らかになった。

#### 【0067】

##### [2] F1031-8-3抗体の作製

F1031-8-3抗体はWO01/22085号公報の実施例7に記載の方法を用いて作製した。簡単に記載すれば、本抗体はヒト血中のCD14蛋白質をマウスに免疫して作製した抗体であり、IsoStrip Mouse Monoclonal antibody Isotyping Kit (Roche) を用いて決定したサブタイプはIgG2b・ $\kappa$ であった。

F1031-8-3抗体の特異性を確認するため、実施例6-(1)記載の大腸菌由来sCD14(1-285)及びWO01/72993号公報の実施例8及び実施例9に記載の方法を用いてCOS細胞により調製したsCD14(1-356)、sCD14(1-307)S286Cを用いて結合活性を測定した。まず、Hybond-C extra (アマシャム バイオサイエンス) にsC

D14 (1-356)、sCD14 (1-307) S286C、sCD14 (1-285) またはBSAを各250 ng/スポットでメンブレン上に固定化し、乾燥後0.05 g/mlのスkimミルク (明治乳業) を含む0.05% Tween 20、PBS (pH6.4) でブロッキングした。室温で1時間静置後、0.5% BSAを含む0.05% Tween 20、PBS (pH6.4) で3  $\mu$ g/mlに希釈したF1031-8-3抗体を加え、室温で1時間反応後、0.05% Tween 20、PBS (pH6.4) で洗浄した。

## 【0068】

次に10%ウサギ血清を含む0.05% Tween 20、PBS (pH6.4) で500倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体 (DAKO) を添加し、37℃で30分間反応した後、同様に洗浄しECLキット (アマシャム バイオサイエンス) で結合活性を確認した。その結果、表1に示すようにF1031-8-3抗体は大腸菌由来sCD14 (1-285)、sCD14 (1-307) S286C、sCD14 (1-356) に結合したが、BSAとは結合せず、全てのタイプのCD14蛋白質を特異的に認識していることが明らかになった。

## 【0069】

表1

	sCD14	sCD14	sCD14	BSA
	(1-356)	(1-307)	(1-285)	
		S286C		
結合活性	+	+	+	-

## 【0070】

## 6-(3) ヒト低分子量CD14の測定系の検討

ヒト低分子量CD14を特異的に検出可能な系を作製するため、実施例3、5、6-(2)に記載の抗体を用いてサンドイッチEIA系を作製した。

## [1] ペルオキシダーゼ標識抗体の調製

ペルオキシダーゼ標識抗体は中根らの方法 (J. Histochem. Cytochem., 22巻、p. 1084、1974年) に従い4mgのペルオキシダーゼ (東洋紡) を蒸留水に溶解し、100mMの過ヨウ素酸を添加し25℃で20分間反応した。反応終了後、1.5%エチレングリコールを添加し25℃で10分間反応させ1mM酢酸緩衝液 (pH4.4) に対して透析した。精製したF1031-8-3抗体及びF1106-13-3抗体それぞれを10mM炭酸緩衝液 (pH9.5) で透析し、4mgに対して0.2M炭酸緩衝液 (pH9.5) を70 $\mu$ L添加して活性化した4mgのペルオキシダーゼを抗体と等量に混合し25℃で2時間反応した。次に4mg/mLの水素化ホウ素ナトリウムを添加し、さらに2時間4℃で反応した。反応液をPBSに透析し、ペルオキシダーゼ標識F1031-8-3抗体及びペルオキシダーゼ標識F1106-13-3抗体を得た。液量を測定し使用した抗体量より抗体濃度を算出した。

【0071】

## [2] サンドイッチEIA系の作製 ①

実施例4で作製したS68抗体をD-PBS (pH7.4) で10 $\mu$ g/mLに希釈し、イムノプレート (Maxisorb、NUNC) の各ウェルに50 $\mu$ L添加した。4℃で一晩反応後、イオン交換水で5回洗浄し、0.1%StabilGuard (SurModics, Inc) と0.1%Tween20を含むD-PBSを各ウェルに100 $\mu$ L添加しブロッキングした。次に1%の健常ヒト血清より3C10を用いて可溶型CD14を除去した血清 (以下、CD14吸収血清と記載)、0.1%BSAを含む76mM PBS (pH7.4) を希釈液として、ヒト正常人血清及びヒト敗血症患者血清を20倍に希釈した希釈検体を調製した。希釈検体をウェル当たり50 $\mu$ L添加し、37℃で2時間反応させた。反応終了後、0.05%Tween20を含む生理食塩水で3回洗浄し、5%ラット血清、1%マウス血清、0.1%Tween20を含む76mM PBS (pH8.0) で0.6 $\mu$ g/mLに希釈したペルオキシダーゼ標識F1031-8-3抗体またはペルオキシダーゼ標識F1106-13-3抗体を各ウェルに50 $\mu$ L添加した。37℃で2時間反応後、同様に5回洗浄し、テトラメ

チルベンジジン溶液 (TMB、BioFix) を各ウェルに添加した。室温で20分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止し、プレート分光光度計 (NJ-2100、日本インターメッド) で450nmの吸光度を測定した。その結果、表2に示すようにS68ペプチド由来抗体を組み合わせた系では正常人では上昇せず、敗血症患者特異的に上昇する、血中可溶性蛋白質が測定できた。

### 【0072】

#### [3] サンドイッチEIA系の作製 ②

実施例5で作製したF1146-17-2抗体をPBS (pH6.4) で120 $\mu$ g/mLに希釈し、イムノプレート (Maxisorb、NUNC) の各ウェルに50 $\mu$ L添加した。56℃で30分反応後、イオン交換水で5回洗浄し、0.1%StabilGuard (SurModics, Inc) と0.1%Tween20 (和光純薬) を含むPBSを各ウェルに100 $\mu$ L添加しブロッキングした。次に1%BSAを含むPBS (pH6.4) を希釈液としてヒト正常人血清及びヒト敗血症患者血清を10倍に希釈した希釈検体を調製した。希釈検体をウェル当たり50 $\mu$ L添加し、25℃で2時間反応した。反応終了後、0.05%Tween20を含む生理食塩水で3回洗浄し、5%ラット血清、1%マウス血清、0.1%Tween20を含む76mMリン酸緩衝液 (pH8.0) で0.5 $\mu$ g/mLに希釈したペルオキシダーゼ標識F1031-8-3抗体を各ウェルに50 $\mu$ L添加した。25℃で2時間反応後、同様に5回洗浄し、テトラメチルベンジジン溶液 (TMB、BioFix) を各ウェルに添加した。室温で20分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止し、プレート分光光度計 (NJ-2100、日本インターメッド) で450nmの吸光度を測定した。その結果、表2に示すようにS68ペプチド特異的モノクローナル抗体はS68抗体同様、正常人血清ではほとんどなく、敗血症患者血清では高値を示す血中可溶性蛋白質が測定できた。

## 【0073】

表2

抗体組み合わせ		測定値	
固相側	標識側	敗血症患者	正常人
S68抗体	F1031-8-3抗体	++	-
S68抗体	F1106-13-3抗体	++	-
F1146-17-2抗体	F1031-8-3抗体	+	-

## 【0074】

## (実施例7) S68抗体の特異性

実施例4で作製したS68抗体の特異性を確認するため、実施例6-(3)と同様な測定で、ペプチドにより阻止されるか検討した。すなわち、敗血症患者血清及び正常人血清の50倍希釈溶液25 $\mu$ LにS68ペプチド(アミノ酸配列53~68番)、実施例1と同様に調製した合成ペプチド(アミノ酸配列53~58番、アミノ酸配列57~62番、アミノ酸配列59~64番)またはネガティブコントロール用ペプチド(CEGNGNNEFESREAC)を0、0.1、1、10 $\mu$ g/mLに希釈したもの25 $\mu$ Lを添加、混合し競合反応させた後、阻止されずに結合した敗血症患者血清及び正常人血清中の低分子量CD14量を測定した。その結果、図1に示すように、低値を示した正常人血清、高値を示した敗血症患者血清ともにS68ペプチドでは阻止されたが、他の部分ペプチド(各々6アミノ酸)及びネガティブコントロール用ペプチドでは阻止されなかった。以上の結果より、S68抗体により血清中に検出されている蛋白質はS68抗体が特異的に認識しているものであることが確認された。また、S68ペプチドの

部分ペプチドである3種類のペプチドでは阻止されないことより、抗体の認識する配列は最低でも7アミノ酸以上の長さを必要とすることが確認された。

#### 【0075】

(実施例8) 作製した抗体の反応速度定数

実施例4で作製したS68抗体と実施例5で作製したF1146-17-2抗体の特異性と反応速度定数をBiacore3000(ビアコア)を用いて解析した。まず、固定化するS68ペプチド-BSAを実施例1記載の方法と同様にマレイミド化BSA(Imject Maleimide Activated BSA, PIERCE)を用いて調製した。次に、S68ペプチド-BSAをアミンカップリングキット(ビアコア)を用いてセンサーチップCM5(ビアコア)に固定化した。測定はランニング緩衝液としてHBS-EP(ビアコア)を使用し、F1146-17-2抗体の希釈列(50、100、150、200、300 nM)をフローセルにインジェクトすることで行った。データ解析はS68ペプチド-BSAのフローセル測定データからリファレンスセルデータを差し引き、Biaevaluation software version 3.0(ビアコア)を用いて実施した。解離定数(KD)を算出した結果、F1146-17-2抗体は $4.8 \times 10^{-9}$ Mと高い親和性を示した。なお、同様に測定した特異精製ウサギS68ペプチドポリクローナル抗体のKDは $2.2 \times 10^{-10}$ Mであった。

#### 【0076】

(実施例9) ヒト低分子量CD14測定キット

9-(1) サンドイッチEIA系の測定キット構成例

実施例6-(3)で敗血症患者の測定では高値を示し、正常人の測定で低値を示した固相抗体、標識抗体の組み合わせを用いた可溶型蛋白質キットの構成例を示す。

①固相抗体: S68抗体またはF1146-17-2抗体を固相化したプレート

②標識抗体: ペルオキシダーゼ標識CD14抗体(例えばF1031-8-3抗体若しくはペルオキシダーゼ標識F1106-13-3抗体)

③基質溶液(例えばテトラメチルベンジジン溶液)

その他の付属品

④プレート洗浄液

⑤試料希釈液

⑥反応停止液

⑦標準品（例えばヒト低分子量CD14可溶性蛋白質若しくはCD14（1-307）S286C

使用機器

⑧プレート分光光度計

【0077】

9-（2） サンドイッチEIA系の測定キットの標準曲線

（1）の測定キットにより、実施例6-（3）[2]と同様な方法で測定した。すなわち、S68抗体をD-PBS（pH7.4）で10 $\mu$ g/mLに希釈し、イムノプレート（Maxisorb、NUNC）の各ウエルに50 $\mu$ L添加した。4℃で一晩反応後、イオン交換水で5回洗浄し、0.1%StabilGuard（SurModics, Inc）と0.1%Tween20を含むD-PBSを各ウエルに100 $\mu$ L添加しブロッキングした。次に1%CD14吸収血清、0.1%BSAを含む76mM PBS（pH7.4）を希釈液として0、3、25、60、100、150ng/mLのCD14（1-307）S286C蛋白質標準品希釈系列を調製した。標準品希釈系列をウエル当たり50 $\mu$ L添加し、37℃で2時間反応させた。反応終了後、0.05%Tween20を含む生理食塩水で3回洗浄し、5%ラット血清、1%マウス血清、ペルオキシダーゼ標識F1031-8-3抗体を0.1%Tween20を含む76mM PBS（pH8.0）で0.6 $\mu$ g/mLに希釈した希釈標識抗体を各ウエルに50 $\mu$ L添加した。37℃で2時間反応後、同様に5回洗浄し、テトラメチルベンジジン溶液（TMB、BioFix）を各ウエルに添加した。室温で20分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止し、プレート分光光度計（NJ-2100、日本インターメッド）で450nmの吸光度を測定した。図2に作成した標準曲線を示した。測定感度0.6ng/mL（ブランク+3SD）の高感度で簡便な測定系が実現された。

## 【0078】

## 9-(3) サンドイッチEIA系の特異性

ヒト血清中に存在する高分子量CD14が作製した測定系に及ぼす影響を検討するため、0～4  $\mu\text{g/mL}$ の濃度の正常人血清由来可溶型CD14をCD14 (1-307) S286C標準品に添加して、(2)と同様に測定を行った。その結果、図3に示すように正常人血清由来可溶型CD14は4  $\mu\text{g/mL}$ でも測定値に影響を及ぼさなかった。この結果より、本サンドイッチEIA系において高分子量CD14との交差反応性は0.3%以下であることがわかった。すなわち、本系はヒト血清高分子量CD14を検出せず、敗血症患者の血清で高値を示す可溶型蛋白質特異的であることが確認された。

## 【0079】

## 9-(4) サンドイッチEIA系の測定キットの評価

(1)のキットの再現性を評価した。(2)と同様に3種類の検体を用いた同時再現性の変動係数(CV)は5.8、3.6、3.5%、測定間再現性は6.2、5.2、5.1%と良好な結果であった。また、添加回収試験の回収率は88～109%と良好であり、抗凝固剤(ヘパリン、クエン酸、EDTA)の影響も認められなかった。以上の結果より、本キットはヒト低分子量CD14を測定するのに十分な性能を有していることが示された。

## 【0080】

## 9-(5) 阻止EIA系の測定キット構成例

- ①固相抗体: S68抗体またはF1146-17-2抗体を固相化したプレート
- ②標識抗原: ペルオキシダーゼ標識抗原(例えば低分子量CD14若しくはペルオキシダーゼ標識S68ペプチド)
- ③基質溶液(例えばテトラメチルベンジジン溶液)
- ④プレート洗浄液
- ⑤試料希釈液
- ⑥反応停止液
- ⑦標準品(例えばヒト低分子量CD14可溶型蛋白質若しくはsCD14 (1-307) S286C)



使用機器

⑧プレート分光光度計

【0081】

9-(6) イムノクロマト系の測定キット構成例

①ストリップ (下記A～Cで構成)

A: S68抗体またはF1146-17-2抗体を固相化したメンブレン

B: 色素標識CD14抗体 (例えばF1031-8-3抗体若しくは色素標識F1106-13-3抗体) を含有する濾紙

C: 検体溶液を吸収する濾紙

②試料希釈液

【0082】

(実施例10) ヒト低分子量CD14の検出

実施例9-(1)に記載の測定キットが検出する敗血症患者血清中の物質を解析するため、敗血症患者血清をゲル濾過クロマトグラフィーカラム Superdex 200PC3, 2/30 (アマシャム バイオサイエンス) で分画し、各分画を実施例9-(1)に記載の測定キット及び市販CD14-EIAキット (IBL-Hamburg) を用いて測定した。分子量の算出はLMWキャリブレーションキットおよびHMWキャリブレーションキット (アマシャムバイオサイエンス) のうちアルドラーゼ (158 kDa)、BSA (67 kDa)、オボアルブミン (43 kDa)、キモトリプシン (25 kDa) を用いてカラムをキャリブレーションして行った。

【0083】

その結果、図4に示すように市販CD14-EIAキットでは分子量約57 kDaの可溶性CD14が検出され、従来より報告のある49～55 kDaの高分子量可溶性CD14蛋白質であると判断された。一方、実施例9-(1)に記載のキットでは分子量35～45 kDa付近に敗血症患者で検出されたヒト低分子量CD14に由来するピークが検出され、また57 kDa付近にはピークが検出されなかったことから、実施例9-(1)に記載のキットは血中に存在する可溶性蛋白質のみを特異的に検出していることが確認された。

ヒト低分子量CD14は、ヒトCD14のみに検出される配列を有するペプチドに特異的な抗体に結合し、またヒトCD14のN末端より17～26番のアミノ酸配列を認識する抗CD14抗体に結合する。また、ゲル濾過で分子量は35～45kDaであり、正常人の血中に存在する高分子量CD14（従来のnative CD14）よりも低分子量である。

## 【0084】

（実施例11） 各種疾患患者血中低分子量CD14の測定

敗血症患者血清は分離菌が同定された10例を使用した（表3）。また、正常人52例（男性31例、女性21例）、及び各種疾患患者（20疾患、60例）を実施例9-（1）に記載の測定キットを用いて測定した。

## 【0085】

## 【表1】

表3

番号	性別	年齢	菌
1	男	41	コアクラーゼ陰性菌
2	女	44	コアクラーゼ陰性菌
3	女	61	ヘシュウム菌
4	男	52	セラチア菌
5	男	37	大腸菌
6	女	67	大腸菌
7	男	70	黄色ブドウ球菌
8	男	51	<i>Pantoea agglomerans</i>
9	女	81	大腸菌
10	男	77	大腸菌

## 【0086】

血清中の低分子量CD14の濃度は正常人で0.008～0.100 $\mu$ g/mLに分布し、平均値は0.04 $\mu$ g/mLであった。敗血症患者では0.190～7.260 $\mu$ g/mLに分布し、平均値は2.0 $\mu$ g/mLであった。低分子量CD14濃度は敗血症患者では正常人及び各種疾患患者に比べ高値であり、各種疾患患者中には正常人と比較して高値を示す疾患は見出せなかった。

## 【0087】

## (実施例 12) 市販の血中可溶型 CD14 ELISA キットとの比較

## 12-(1) 各種疾患患者血中可溶型 CD14 の測定

実施例 11 の検体を市販 CD14-EIA キット (IBL-Hamburg) を用いて測定した。血清中の可溶型 CD14 (低分子量 CD14 と高分子量 CD14 の合計と推定) の濃度は正常人で  $5.6 \sim 11.2 \mu\text{g/mL}$  に分布し、敗血症患者では高値例が認められた。しかしながら、各種疾患患者血清中においても可溶型 CD14 が高値を示す例が多数認められ、敗血症患者との間に差は認められなかった。

【0088】

## 12-(2) S68 抗体を用いたキットとの比較

実施例 11 で測定した低分子量 CD14 の測定値と比較検討を行った。表 4 に示すように市販 CD14-EIA キットでは正常、各種疾患、敗血症間に最大 1.7 倍程度の差しか認められないのに対して実施例 9-(1) の測定キットでは正常人と各種疾患の間に差は認められないが、正常人と敗血症の間には 50 倍の差が認められ、実施例 9-(1) の測定キットの測定値が敗血症で特異的に上昇することが明らかになった。

【0089】

表 4

	血中 CD14 濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )			比
	正常	各種疾患	敗血症	敗血症/正常
実施例 9-(1) の測定キット	0.04	0.06	2.0	50.0
市販 CD14-EIA	7.6	9.0	13.2	1.7

## 【0090】

測定した正常人の平均値+3 S. D. をカットオフ値（低分子量CD14-EIA:  $0.134 \mu\text{g/ml}$ 、市販CD14-EIA:  $11.14 \mu\text{g/ml}$ ）として陽性例（敗血症）と陰性例（正常+各種疾患）に分けて解析した結果を表5に示した。その結果に基づき、両キットの一致率（（EIA陽性一致数+EIA陰性一致数）/総数 $\times 100$ ）、感度（EIA陽性一致数/陽性例 $\times 100$ ）、特異度（EIA陰性一致数/陰性例 $\times 100$ ）を算出したところ、低分子量CD14-EIAでは一致率94.3%、感度100.0%、特異度93.8%とカットオフ値を設定することにより敗血症の鑑別診断に有用であることが明らかになった。一方、市販のCD14-EIAでは感度、特異度ともに敗血症を診断できるほどの特異性は認められなかった。

## 【0091】

表5

分類	陽性例	陰性例		合計
疾患	敗血症	正常	各種疾患	
実施例9-(1)の測定キット	10	51	54	115
市販CD14-EIA	6	51	45	102
合計	10	52	60	122

## 【0092】

表6

	実施例9の測定キット	市販CD14-EIA
一致率(%)	94.3%	83.6%
感度(%)	100.0%	60.0%
特異度(%)	93.8%	85.7%

## 【0093】

(実施例13) R285ペプチドポリクローナル抗体の特異性

実施例3で作製したR285ペプチドポリクローナル抗体の特異性を確認するため、sCD14(1-356)、sCD14(1-307)S286C、大腸菌由来sCD14(1-285)を用いて結合活性を測定した。まず、Hybond-Extra(アマシャム バイオサイエンス)に各種CD14とウシ血清アルブミン(以下、BSAと記載)を20~30ng/スポットでメンブレン上に固定化し、乾燥後0.05g/mlのスキนมilk(明治乳業)を含む0.05%Tween20、PBS(pH6.4)でブロッキングした。室温で1時間静置後、0.5%BSAを含む0.05%Tween20、PBS(pH6.4)で3μg/mlに希釈したR285ペプチドポリクローナル抗体を加え、室温で1時間反応後、0.05%Tween20、PBS(pH6.4)で洗浄した。次に10%ヤギ血清を含む0.05%Tween20、PBS(pH6.4)で500倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギイムノグロブリン抗体(DAKO)を添加し、37℃で30分間反応した後、同様に洗浄しECLキット(アマシャム バイオサイエンス)を用いてR285ペプチドポリクローナル抗体の特異性を確認した。その結果、表7に示すようにR285ペプチドポリクローナル抗体は大腸菌由来sCD14(1-285)にのみ結合することが明

らかになった。本抗体はCD14 (1-356) とは結合しなかった。

【0094】

表7

抗原	大腸菌 sCD14	sCD14	sCD14	BSA
	(1-285)	(1-307)	(1-356)	
		S286C		
結合活性	+	-	-	-

【0095】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.

&lt;120&gt; Antibody binding with a low molecular human CD14 protein

&lt;130&gt; MD0646

&lt;160&gt; 7

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 1

Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala Asp Thr Val Lys

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 356

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 2

Thr Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu Asp Phe Arg Cys Val  
Cys Asn Phe Ser Glu Pro Gln Pro Asp Trp Ser Glu Ala Phe Gln Cys  
Val Ser Ala Val Glu Val Glu Ile His Ala Gly Gly Leu Asn Leu Glu  
Pro Phe Leu Lys Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala  
Asp Thr Val Lys Ala Leu Arg Val Arg Arg Leu Thr Val Gly Ala Ala  
Gln Val Pro Ala Gln Leu Leu Val Gly Ala Leu Arg Val Leu Ala Tyr  
Ser Arg Leu Lys Glu Leu Thr Leu Glu Asp Leu Lys Ile Thr Gly Thr  
Met Pro Pro Leu Pro Leu Glu Ala Thr Gly Leu Ala Leu Ser Ser Leu

Arg Leu Arg Asn Val Ser Trp Ala Thr Gly Arg Ser Trp Leu Ala Glu  
Leu Gln Gln Trp Leu Lys Pro Gly Leu Lys Val Leu Ser Ile Ala Gln  
Ala His Ser Pro Ala Phe Ser Cys Glu Gln Val Arg Ala Phe Pro Ala  
Leu Thr Ser Leu Asp Leu Ser Asp Asn Pro Gly Leu Gly Glu Arg Gly  
Leu Met Ala Ala Leu Cys Pro His Lys Phe Pro Ala Ile Gln Asn Leu  
Ala Leu Arg Asn Thr Gly Ile Glu Thr Pro Thr Gly Val Cys Ala Ala  
Leu Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro His Ser Leu Asp Leu Ser His Asn  
Ser Leu Arg Ala Thr Val Asn Pro Ser Ala Pro Arg Cys Met Trp Ser  
Ser Ala Leu Asn Ser Leu Asn Leu Ser Phe Ala Gly Leu Glu Gln Val  
Pro Lys Gly Leu Pro Ala Lys Leu Arg Val Leu Asp Leu Ser Cys Asn  
Arg Leu Asn Arg Ala Pro Gln Pro Asp Glu Leu Pro Glu Val Asp Asn  
Leu Thr Leu Asp Gly Asn Pro Phe Leu Val Pro Gly Thr Ala Leu Pro  
His Glu Gly Ser Met Asn Ser Gly Val Val Pro Ala Cys Ala Arg Ser  
Thr Leu Ser Val Gly Val Ser Gly Thr Leu Val Leu Leu Gln Gly Ala  
Arg Gly Phe Ala

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> human

<400> 3

Gly Leu Pro Ala Lys Leu Arg Val Leu Asp Leu

<210> 4

<211> 13

<212> DNA

<213> human

<223> oligomer:8 linkS

<400> 4



agcttaggaa ttt

<210> 5

<211> 13

<212> DNA

<213> human

<223> oligomer:8 linkA

<400> 5

ctagaaattc cta

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> human

<223> antisense primer

<400> 6

acatctagat gaccagcca gaacct

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> human

<223> antisense primer

<400> 7

tttggatcct tactagagat cgagcaatct

**【図面の簡単な説明】**

【図1】 S68ペプチドポリクローナル抗体と低分子量CD14蛋白質の結合をS68ペプチドのみが阻止する結果を示した図である。(A)は、正常人血清中で結合していない状態を示し、(B)は、敗血症患者血清中でのS68ペプチドの結合阻害を示している。

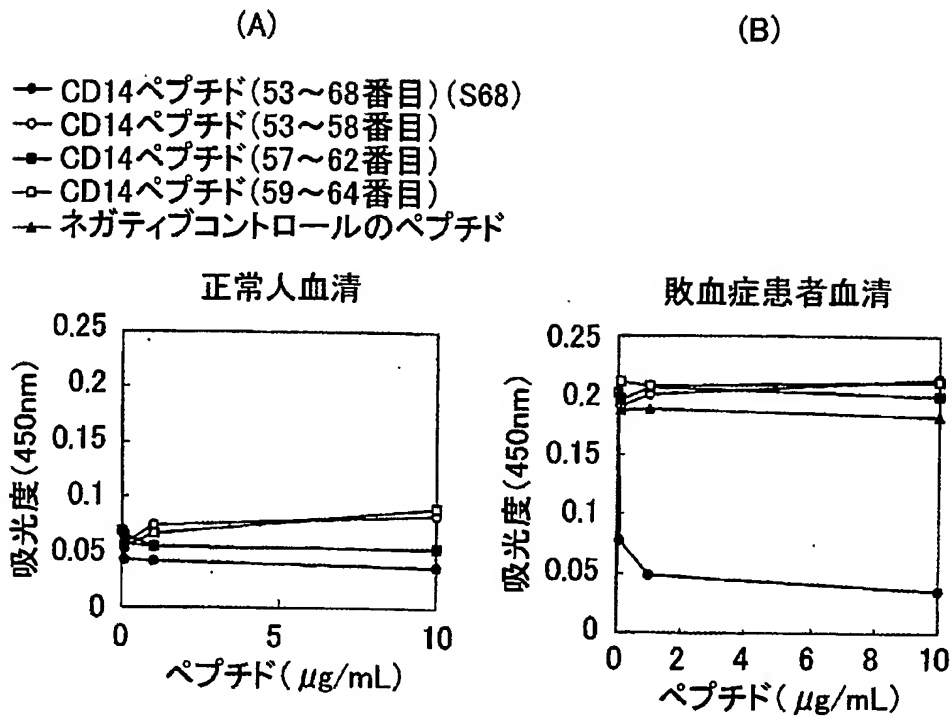
【図2】 sCD14 (1-307) S286C蛋白質を用いた本発明の低分子量CD14-EIAキットの標準曲線を示した図である。

【図3】 sCD14 (1-307) S286C蛋白質を用いて本発明の低分子量CD14-EIAキットの測定値に正常人血清由来可溶型CD14蛋白質が影響しないことを示した図である。

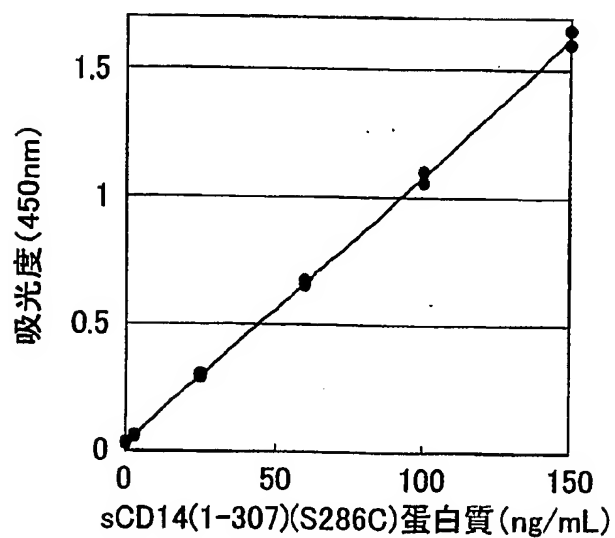
【図4】 ゲル濾過クロマトグラフィーにより敗血症患者血中の低分子量CD14蛋白質及び高分子量CD14蛋白質をそれぞれ低分子量CD14-EIAキット及び市販CD14-EIAキット (IBL-Hamburg) により解析した結果を示した図である。

【書類名】 図面

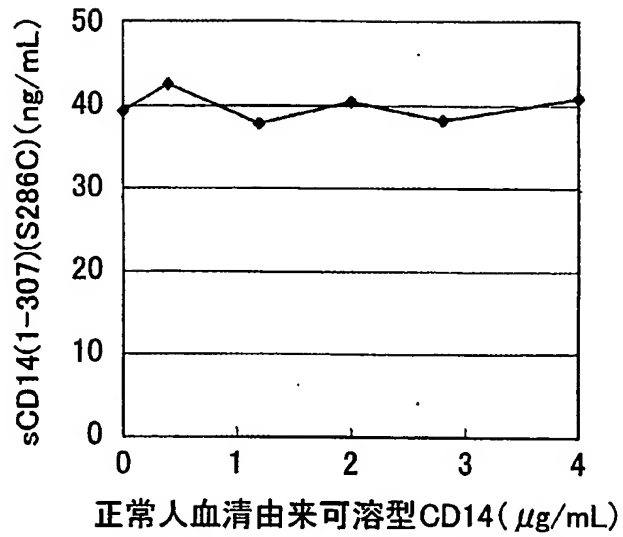
【図1】



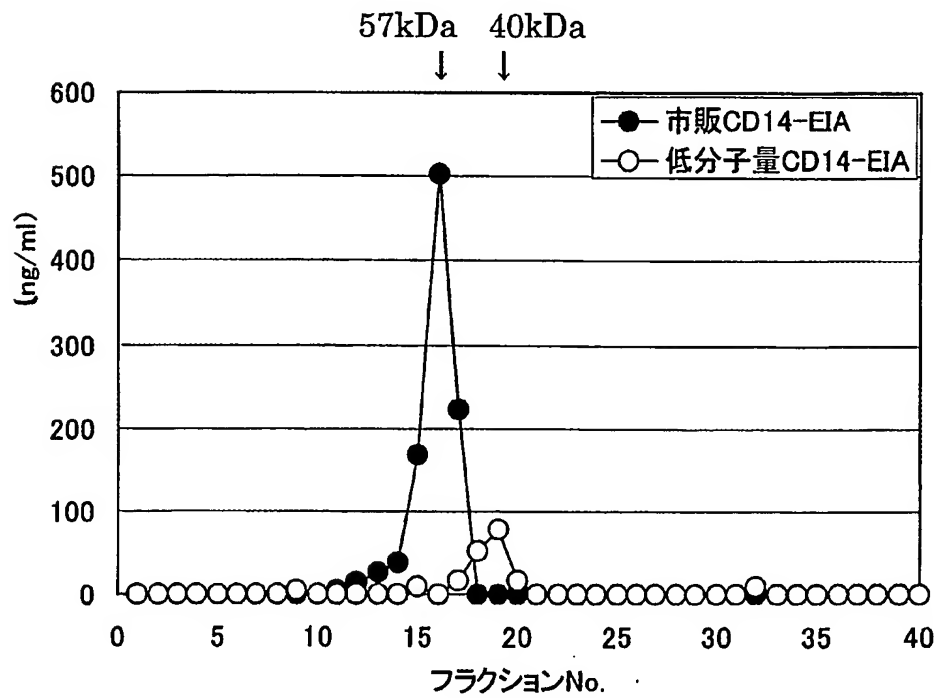
【図2】



【図3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】敗血症の診断に有用な C D 1 4 の特定の分子種に選択的に結合する抗体を提供する。

【解決手段】配列番号 1 に記載の 1 6 アミノ酸残基からなるペプチドとは結合し、ヒト高分子量 C D 1 4 とは結合しない抗体、およびこの抗体を用いた低分子量 C D 1 4 測定キット。

【選択図】なし

特願2002-328866

出願人履歴情報

識別番号

[000181147]

1. 変更年月日  
[変更理由]

1990年 8月29日

新規登録

住 所  
氏 名

東京都新宿区四谷1丁目7番地  
持田製薬株式会社